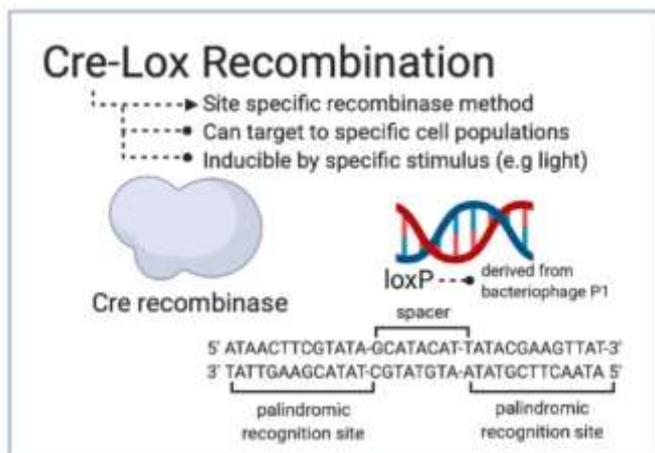


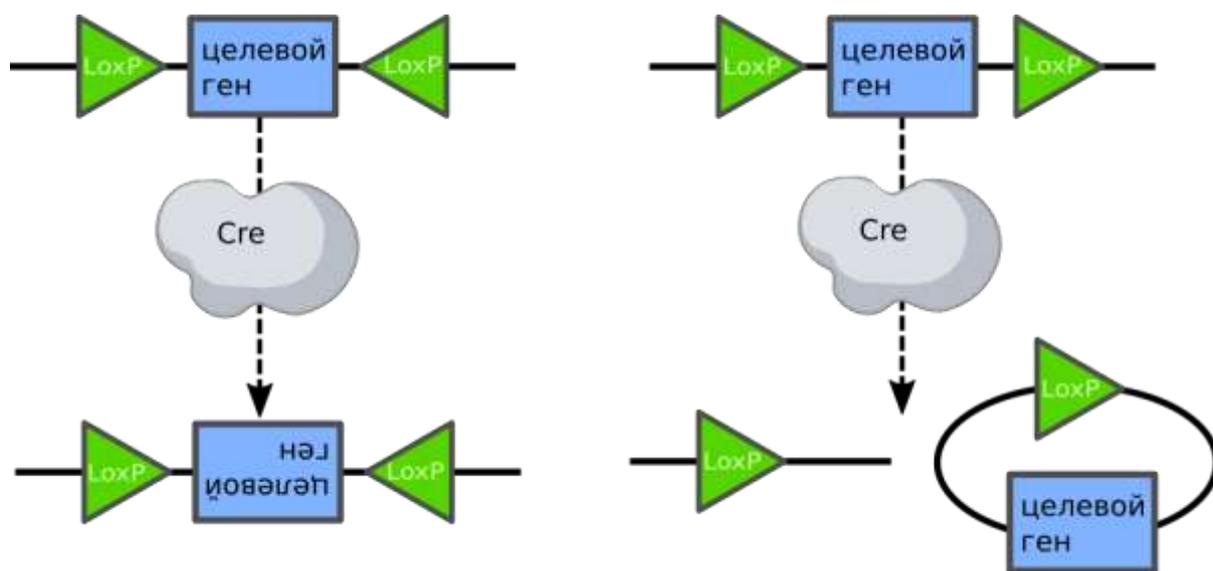


Биология для школьников 7 – 11 класса (отборочный этап)
Задача 6. Cre-Lox

При исследовании молекулярных механизмов тех или иных сигнальных процессов в клетке часто возникает задача включить или выключить определенный ген. Популярным способом решения этой задачи является использование индуцируемой Cre-Lox рекомбиназной системы.

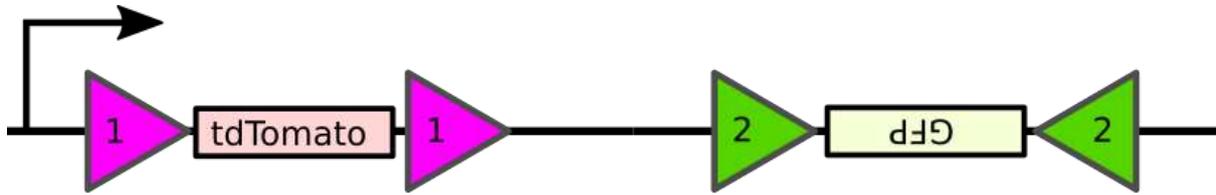


Белок Cre узнает так называемые LoxP-сайты — пары палиндромных повторов, расположенных по бокам короткой спейсерной последовательности, определяющей “направление” LoxP-сайта. Результат работы Cre-рекомбиназы зависит от взаимной ориентации пары LoxP-сайтов. Одними из возможных результатов являются делеции и обращения ориентации последовательности ДНК между LoxP-сайтами, как показано на схеме (LoxP-сайты обычно обозначаются треугольниками, ориентация треугольника указывает ориентацию LoxP-сайта).



Сейчас известно несколько вариантов LoxP-сайтов, отличающихся последовательностью нуклеотидов в спейсере. При этом Cre-рекомбиназа может узнавать пары любых вариантов, но только одинаковых. Часто используют генно-инженерные варианты Cre-рекомбиназы, делая её индуцируемой специальными веществами, например, тамоксифеном.

Студент Петр выращивал культуру клеток, в генетический код которых были встроены последовательности, кодирующие флуоресцентные белки (красный – tdTomato и зеленый – GFP), обрамленные двумя разными LoxP-сайтами (обозначены цветами и цифрами 1 и 2):



Культура была дополнительно трансфицирована аденоассоциированным вирусом, кодирующим индуцируемую Cre-рекомбиназу. Через неделю после суточной обработки культуры тамоксифеном Петр поместил чашку с культурой под флуоресцентный микроскоп и увидел результат, который его удивил.

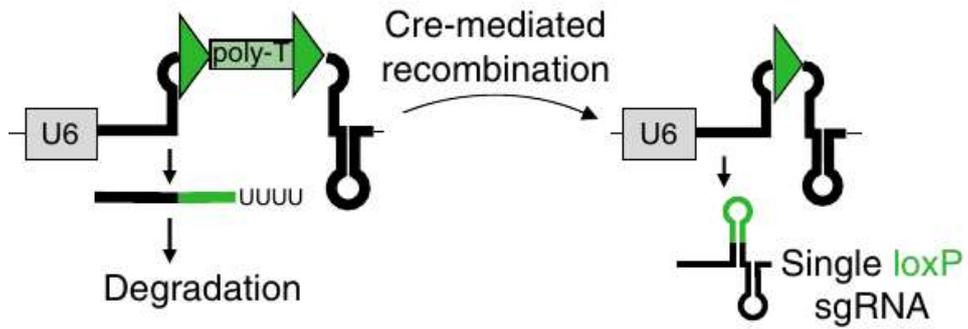
1. Как вы считаете, что увидел Петр? Ответ обоснуйте. **(2 балла)**

- Все клетки перестали флуоресцировать.
- Все клетки флуоресцировали красным светом.
- Все клетки флуоресцировали зеленым светом.
- Часть клеток светилась зеленым светом, а часть не флуоресцировала.
- Часть клеток светилась красным светом, а часть не флуоресцировала.
- Часть клеток светилась зеленым светом, а часть – красным.
- Часть клеток светилась желтым цветом, а часть – зеленым.
- Другой вариант ответа.

2. Какой должна быть комбинации LoxP-сайтов и кодирующих последовательностей, чтобы до индукции Cre-рекомбиназы все клетки были зелеными, а после – светились красным? **(2 балла)**

Для работы Cre-Lox системы нужен генно-инженерный организм с уже внедренными на нужные места LoxP-сайтами, потому что Cre-рекомбиназа распознает только их. Для другого популярного метода редактирования генома, CRISPR, нужны два компонента: белок Cas9 и направляющая РНК (sgRNA), ответственная за распознавание целевой последовательности в геноме. Cas9, связанный с направляющей РНК, создает двуниевые разрывы в ДНК рядом с целевой последовательностью, что, в итоге, позволяет “выключать” тот или иной ген, производить вставки и замены генетического кода. В одной из недавних работ в журнале из группы Nature предлагается метод управления работой CRISPR-системы при помощи Cre-зависимого синтеза направляющей РНК.

3. Ниже приведена схема **включения** CRISPR-системы после активации Cre-рекомбиназы. Постарайтесь расшифровать эту схему и объяснить, как она работает. **(2 балла)**. Почему зеленая часть sgРНК в финальной стадии показана как шпилька? **(1 балл)**



4. Предложите аналогичную схему, но в которой активация Cre-рекомбиназы **выключит** CRISPR-систему. (3 балла)

Всего – 10 баллов